

(translation)

D. Johnson

6-21-00

#2  
Priority  
Papers

JC511 U.S. PTO  
09/53422  
03/24/00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of  
the following application as filed with this office.

Date of Application: March 25, 1999

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 11-081694

Applicant(s): Japan as Represented by Director General of Hokkaido  
National Agricultural Experiment Station

Date of this certificate: January 21, 2000

Commissioner,  
Patent Office                   Takahiko KONDO

Certificate No. 2000-3000185

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JC511 U.S. PRO  
09/534229  
03/24/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 1999年 3月25日

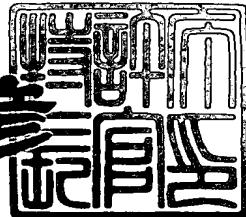
出願番号  
Application Number: 平成11年特許願第081694号

出願人  
Applicant(s): 農林水産省北海道農業試験場長

2000年 1月21日

特許庁長官  
Commissioner.  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3000185

【書類名】 特許願  
【整理番号】 11P97  
【提出日】 平成11年 3月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A01N 63/02  
【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 農試宿舎1号棟20  
1号  
【氏名】 川上 順  
【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 農試宿舎1号棟30  
4号  
【氏名】 寺見 文宏  
【特許出願人】  
【識別番号】 591075364  
【氏名又は名称】 農林水産省北海道農業試験場長 稲葉 忠興  
【代理人】  
【識別番号】 100063565  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小橋 信淳  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 低温発現型キチナーゼ遺伝子およびその単離方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項2】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、771塩基・256アミノ酸からなり、オオムギキチナーゼ遺伝子と98%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つことを特徴とする請求項1記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項3】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項1記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項4】 図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項5】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、972塩基・323アミノ酸からなり、ライムギキチナーゼ遺伝子と68%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つことを特徴とする請求項4記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項6】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項4記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項7】 図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする秋播小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項8】 上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、960塩基・319アミノ酸からなり、春播小麦キチナーゼ遺伝子と98%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つことを特徴とする請求項7記載の秋播小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項9】 上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項7記載の秋播小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項10】 低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法であって、  
ハードニング（低温順化）による病害抵抗性の向上に関与する低温発現型キチ

ナーゼ遺伝子を単離することを目的として、充分にハードニングを施した秋播小麥系統P I 1 7 3 4 3 8（高度雪腐病抵抗性を有する）からmRNAを抽出することと、

上記mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリーを作製することと

EMBL/Genebank/DDBJ DNAデータバンクによって公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考にして、2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを設計することと、

設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のcDNAを鋳型にPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）反応を行うことによって、キチナーゼ遺伝子の断片を増幅し増幅断片を得ることと、

上記の増幅断片をプローブとして、上記のcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離することと、

を特徴とする低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法。

【請求項11】 上記2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーのうち

一方は、以下の塩基配列

(Forward) : 5' C - A - C - G - A - G - A - C - C - A - C - N - G -  
G - C - G - G - N - T - G - G - C (配列番号4)

を有し、

他方は、以下の塩基配列

(Reverse) : 5' A - C - N - A - A - T - A - T - C - A - T - C - A -  
A - C - G - G - C - G - G (配列番号5)

を有することを特徴とする請求項10記載の低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、キチナーゼ (chitinase) 遺伝子およびその単離方法に関し、詳しくは、低温環境下において植物を加害する雪腐病菌などの好冷性植物病原菌に対して、その抵抗性を植物に付与する機能を持つキチナーゼ遺伝子およびその単離方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

長期にわたる厳寒積雪地帯では、ムギ類・牧草類などの越冬作物は低温環境下 (0℃以下) または積雪下 (0℃、暗黒下) で長期間の生存を余儀なくされる。この環境下において越冬作物は、好冷性糸状菌である雪腐病菌に犯され、抵抗性の低い作物は枯死してしまう。

**【0003】**

現在の秋播小麦栽培では、根雪前の農薬散布が雪腐病の防除に必須となっているが、根雪開始時期が不確実なため、十分な散布が不可能となる事例が多い。そこで、根雪前の農薬散布を行わなくとも済むように、雪腐病に対する十分な抵抗性を持つ品種の育成が望まれている。

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、従来の交雑に基づいた育種技術では十分な抵抗性をもつ優良品種の育成がなされておらず、また、優良品種の育成には長い年月を要することから、より有効な手段例えば遺伝子工学的な手段による品種の改良が強く求められている。

**【0005】**

本発明者らは、上記した課題を解決するため長期にわたる研究を重ね、その結果、次のような結論をまとめた。すなわち、雪腐病菌に対する植物体の抵抗性は、秋期から冬期にかけての気温低下に伴う低温順化（以下、ハードニングと称す）により誘導されるが、後述する本発明の3種類のキチナーゼ遺伝子はこのハー

ドニング中に発現が見られ、その翻訳産物が雪腐病菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するということが判った。

#### 【0006】

従って本発明の目的は、低温環境下で酵素機能を有し植物体に導入されることで植物に対し病害抵抗性を付与するキチナーゼ遺伝子を提供することにある。

#### 【0007】

本発明における他の目的は、低温環境下で酵素機能を有し植物体に導入されることで植物に対し病害抵抗性を付与するキチナーゼ遺伝子の単離方法を提供することにある。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

上記した目的を達成するために本発明は、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有する小麦キチナーゼ遺伝子である。

#### 【0009】

図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、771塩基・256アミノ酸からなり、大麦キチナーゼ遺伝子と98%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つものである。

#### 【0010】

また、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

#### 【0011】

そして、上記した目的を達成するために本発明は、図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する小麦キチナーゼ遺伝子である。

#### 【0012】

図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、972塩基・323アミノ酸からなり、ライ麦キチナーゼ遺伝子と68%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つものである。

## 【0013】

また、図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

## 【0014】

さらに、上記した目的を達成するために本発明は、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する秋播小麦キチナーゼ遺伝子である。

## 【0015】

図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、960塩基・319アミノ酸からなり、春播小麦キチナーゼ遺伝子と98%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つものである。

## 【0016】

また、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

## 【0017】

さらに、上記した目的を達成するために本発明は、低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法であって、

ハードニング（低温順化）による病害抵抗性の向上に関与する低温発現型キチナーゼ遺伝子を単離することを目的として、充分にハードニングを施した秋播小麦PI173438（高度雪腐病抵抗性を有する）からmRNAを抽出することと、

上記mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリーを作製することと

EMBL/Genebank/DDBJ DNAデータバンクによって公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考にして、2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを設計することと、

設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のc

DNAを鑄型にPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)反応を行うことによって、キチナーゼ遺伝子の断片を増幅し増幅断片を得ることと、

上記の増幅断片をプローブとして、上記のcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離することと、

を特徴とする。

#### 【0018】

上記2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーのうち、

一方は、以下の塩基配列

(Forward) : 5' C-A-C-G-A-G-A-C-C-A-C-N-G-G-C-G-G-N-T-G-G-C (配列番号4)

を有し、

他方は、以下の塩基配列

(Reverse) : 5' A-C-N-A-A-T-A-T-C-A-T-C-A-A-C-G-G-C-G-G (配列番号5)

を有する。

#### 【0019】

すなわち、本発明のキチナーゼ遺伝子は、低温発現型キチナーゼ遺伝子である。この低温発現型キチナーゼ遺伝子を作製する方法としては、具体的には下記のようなプロセスによって行われている。

#### 【0020】

詳しくは、札幌市の自然条件下で11月22日までハードニング(低温順化)させた高度雪腐病抵抗性を有する秋播小麦PI173438からmRNAを抽出する。そして、該mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリーを作製する。

#### 【0021】

次いで、EMBL/Gene bank/DDBJ DNAデータバンクにおいて公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子の塩基配列を詳細に解析し、すべての遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考に2種類のキ

チナーゼ遺伝子の特異的プライマーを設計する。

#### 【0022】

設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のcDNAを鑄型にPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）反応を行って、キチナーゼ遺伝子の予想された断片（400塩基前後）を増幅し、増幅部分の断片を単離する。

#### 【0023】

そして、それぞれの増幅断片をプローブとして、上記のcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離する。単離したクローンの塩基配列を解析し、小麦では新規なキチナーゼ遺伝子が3種類単離されたことが明かとなる。

#### 【0024】

##### 【実施例】

###### 1) 耐雪性秋播小麦系統PI173438からの cDNA及びcDNAライブラリーの調製

9月下旬にバットに播種し、自然条件下で11月22日までハードニングさせた秋播小麦 (*Triticum aestivum* L.) PI173438 (高度雪腐病抵抗性を有する) のクラウン部分よりmRNAを常法により抽出した。得られたmRNA 5 μgを用いてcDNA合成キット (STRATAGENE社製) を利用してcDNAを合成した。cDNAの両端末にアダプターを接続後、λ ZAP Expression vector (STRATAGENE社製) に組み込み、約6x10<sup>6</sup>pfuのcDNAライブラリーを作製した。

#### 【0025】

###### 2) キチナーゼ遺伝子プライマーを用いて、 上記のcDNAを鑄型に行われるPCR反応

既知 (EMBL/Gene bank/DDBJ DNAデータバンクにおいて公開されている) のキチナーゼ遺伝子の塩基配列が高度に保存された領域に基づいて合成された、

(Forward) : 5 'C-A-C-G-A-G-A-C-C-A-C-N-G-

G-C-G-G-N-T-G-G-G-C (配列番号4)

という塩基配列を有するキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーと  
(Reverse) : 5 'A-C-N-A-A-T-A-T-C-A-T-C-A-A-C-G-G-C-G-G (配列番号5)

という塩基配列を有するキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーと、  
を用いて、上記により合成されたcDNAを錆型にPCR反応を行った。

#### 【0026】

上記PCR反応は、50μlの反応系で行われた。日本ジーン社製TaqDNAポリメラーゼ(5 units/μl)を1μl、10×ポリメラーゼバッファー(MgCl<sub>2</sub>を含む)を5μl、dNTP液(10 mM)を5μl、上記の各プライマー(1.2 μM)を2μl、および上記で合成したcDNAを約10ng加えて、反応液全量を蒸留水で50μlとした。PCRの反応条件および反応回数は、以下の表1に示す。

#### 【0027】

【表1】

PCRの反応条件および反応回数

変性	94℃	1分間	1回
変性	94℃	1分間	
アニーリング	48℃	1分間	
伸張反応	72℃	1分間	30回
伸張反応	72℃	2分間	1回

(表1において、「変性」は、DNAの二本鎖をそれぞれの一本鎖に変える反応を意味し、「伸張反応」は、DNA断片の增幅反応を意味し、「30回」は、変性とアニーリングと伸張反応とを含むサイクルを30回にわたり繰り返すことを意味している)

## 【0028】

上記PCR反応の結果、配列番号4の塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5の塩基配列を有するプライマーから、予測された長さの断片（400塩基前後）が増幅された。そして、常法に基づき市販の自動シーケンサー（ABI社製、モデル373S）を利用し、得られた増幅断片の塩基配列を決定することで、既知のキチナーゼ遺伝子と高い相同意をもつ新規なキチナーゼ遺伝子の断片であることが確認された。

## 【0029】

## 3) 本発明のキチナーゼ遺伝子を有する

## cDNAクローンの単離・塩基配列の決定

上記により得られたcDNAライブラリーのうちおよそ10万クローンをプロットしたフィルターを利用して、上記により得られた新規キチナーゼ遺伝子の断片をラジオアイソトープで標識したプローブを利用してハイブリダイゼーションアッセイを行った。

## 【0030】

ハイブリダイゼーション反応は、50%ホルムアミド、5×SSPE液、5×デンハルト液、0.5%SDS液、0.2mg/mlのサケ精子DNAを加え、42℃の条件下で16時間にわたって行われた。

## 【0031】

その後、上記フィルターに対して、2×SSC液および0.1%SDS液を用いて55℃の条件下で10分間を必要とする洗浄を2回にわたり実施した。洗浄されたフィルターとX線フィルムを利用して、アイソトープでラベルされたプローブと結合した陽性クローンをスクリーニングした。

## 【0032】

このように得られた約45個の陽性クローンについてそれぞれ、ABI社製DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた候補クローンの塩基配列の解析から、図1～3に示す配列番号1～3記載のアミノ酸配列を有する3種類の新規キチナーゼ遺伝子がそれぞれ秋播小麦から単離されたことが判った。

## 【0033】

具体的には、単離されたのは、a) 771塩基・256アミノ酸からり、大麦キチナーゼ遺伝子と98%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持ち、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列をする小麦キチナーゼ遺伝子、b) 972塩基・323アミノ酸からなり、ライムギキチナーゼ遺伝子と68%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持ち、図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する小麦キチナーゼ遺伝子、c) 960塩基・319アミノ酸からなり、春播コムギキチナーゼと95%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持ち、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する秋播小麦キチナーゼ遺伝子である。

## 【0034】

## 【発明の効果】

本発明によれば、既知のキチナーゼ遺伝子とアミノ酸配列が異なり、腐雪病に対する高度の抵抗性を有し、小麦では新規なキチナーゼ遺伝子が提供される。本発明における3種類のキチナーゼ遺伝子は、低温でのキチン分解能を有することから、上記3種類のキチナーゼ遺伝子のうち何れかを植物体に導入することによって、低温環境下で植物を加害する病原菌に対しても抵抗性を付与することになり、雪腐病菌など好冷性植物病原菌に対して高度の抵抗性を有する植物品種を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

配列番号1記載のアミノ酸配列を示す図である。

## 【図2】

配列番号2記載のアミノ酸配列を示す図である。

## 【図3】

配列番号3記載のアミノ酸配列を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

配列番号1

10	20	30	40	50	60
MARFAALAVC	AAALLLAVAA	GGAAAQGVGS	VITRSVYASM	LPNRDNSLCP	ARGFYTYDAF
70	80	90	100	110	120
IAAAANTFPGF	GTTGSADDIK	RDLAAFFGQT	SHETTGTRG	AADQFQWGYC	FKEEEISKATS
130	140	150	160	170	180
PPYYGRGPIQ	LTGRSNYDLA	GRAIGKDLVS	NPDLVSTDAT	VSFRRTAMWF	MTAQGNKPSC
190	200	210	220	230	240
HNVVALRRWTP	TAADTAAGRV	PGYGVITNII	NGGLECCGMGR	NDANVDRIGY	YTRYCGMLGT
250	260	270	280	290	300
ATGGNLDCYT	QRNFAS*	.....	.....	.....	.....

【図2】

配列番号2

10	20	30	40	50	60
MSTLRARCAT	AVLAVVLAIA	AVTPATAEQC	GSQAGGAKCA	DCLCCSQFGF	CGTTSDYCGP
70	80	90	100	110	120
RCQSQCTGCG	GGGGGVASIV	SRDLFERFL	HRNDAACLAR	GFYTYDAFLA	AAGAFPAFGT
130	140	150	160	170	180
TGDLDTRKRE	VAAFFGQTSH	ETTGGWPTAP	DGPFSWGYCF	KQEQQSPPSY	CDQSADWPCA
190	200	210	220	230	240
PGKQYYGRGP	IQLTHNYNYG	PAGRAIGVDL	LNNPDLVATD	PTVAFKTAIW	FWMTTQSNKP
250	260	270	280	290	300
SCHDVITGLW	TPTARDSAAG	RVPGYGVITN	VINGGIECGM	GQNDKVADRI	GFYKRYCDIF
310	320	330	340	350	360
GIGYGNLDC	YNQLSFNVGL	AAQ*	.....	.....	.....

【図3】

## 配列番号3

10	20	30	40	50	60
MRGVVVVAML AAAFAVSAHA EQCGSQAGGA TCPNCLCCSK FGFCGTTSDY CGTGCQSQCN					
70	80	90	100	110	120
GCSGGTPVPV PTPSGGVSS IISQSLFDQM LLHRNDAACL AKGFYNYGAF VAAANSFSGF					
130	140	150	160	170	180
ATTGSTDVKK REVAAFLAQI SHETGGWPT APDGPYSWGY CFNQERGATS DYCTPSSQWP					
190	200	210	220	230	240
CAPGKKYFGR GPIQISHNYN YGPAGQAIGT DLLNNPDLVA SDATVSFKTA LWFWMTPQSP					
250	260	270	280	290	300
KPSSHHDVITG RWSPSGADQA AGRVPGYGVVI TNIINGGLEC GRGQDGRVAD RIGFYKRYCD					
310	320	330	340	350	360
LLGVSYGDNL DCYNQRPF*					
.....					

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低温環境下で酵素機能を有し、植物体に導入することにより、低温環境下において好冷性植物病原菌に対する抵抗性を植物に付与する、小麦では新規なキチナーゼ遺伝子およびその単離方法を提供する。

【解決手段】 図1～3に示す配列番号1～3記載のアミノ酸配列を持つ小麦では新規なキチナーゼ遺伝子は、ともに低温環境下で酵素機能を有し、植物体に導入することにより、好冷性植物病原菌に対する抵抗性を植物に付与する。

【効果】 上記3種類のキチナーゼ遺伝子は低温でのキチン分解能を有することから、該3種類のキチナーゼ遺伝子のうち何れかを植物体に導入することにより、植物に対し好冷性植物病原菌に対する抵抗性を付与することが可能となり、低温環境下で強い病害抵抗性を有する植物品種を提供することができる。

【選択図】 図1

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第081694号
受付番号	59900275075
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成11年 3月26日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 591075364  
 【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地  
 【氏名又は名称】 農林水産省北海道農業試験場長

## 【代理人】

【識別番号】 100063565  
 【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿南一丁目6番10号 恵比寿  
 MFビル14号館4階 小橋特許事務所  
 【氏名又は名称】 小橋 信淳

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [591075364]

1. 変更年月日 1991年 3月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地

氏 名 北海道農業試験場長